

ISSN 1000-0933
CN 11-2031/Q

生态学报

Acta Ecologica Sinica



第32卷 第1期 Vol.32 No.1 **2012**

中国生态学会
中国科学院生态环境研究中心
科学出版社

主办
出版



中国科学院科学出版基金资助出版

生态学报

(SHENGTAI XUEBAO)

第 32 卷 第 1 期

2012 年 1 月 (半月刊)

目 次

局域种群的 Allee 效应和集合种群的同步性	刘志广, 赵 雪, 张丰盘, 等 (1)
叶片毛尖对齿肋赤藓结皮凝结水形成及蒸发的影响	陶 冶, 张元明 (7)
长江口锋面附近咸淡水混合对浮游植物生长影响的现场培养	王 奎, 陈建芳, 李宏亮, 等 (17)
河流流量对流域下垫面特性的响应	田 迪, 李叙勇, Donald E. Weller (27)
中国中东部平原亚热带湿润区湖泊营养物生态分区	柯新利, 刘 曼, 邓祥征 (38)
基于氮磷比解析太湖苕溪水体营养现状及应对策略	聂泽宇, 梁新强, 邢 波, 等 (48)
滇池外海蓝藻水华爆发反演及规律探讨	盛 虎, 郭怀成, 刘 慧, 等 (56)
采伐干扰对华北落叶松细根生物量空间异质性的影响	杨秀云, 韩有志, 张芸香, 等 (64)
松嫩草原榆树疏林对不同干扰的响应	刘 利, 王 赫, 林长存, 等 (74)
天山北坡不同海拔梯度山地草原生态系统地上净初级生产力对气候变化及放牧的响应	周德成, 罗格平, 韩其飞, 等 (81)
草原化荒漠草本植物对人工施加磷素的响应	苏洁琼, 李新荣, 冯 丽, 等 (93)
自然和人工管理驱动下盐城海滨湿地景观格局演变特征与空间差异	张华兵, 刘红玉, 郝敬锋, 等 (101)
晋、陕、宁、蒙柠条锦鸡儿群落物种多样性对放牧干扰和气象因子的响应	周 伶, 上官铁梁, 郭东罡, 等 (111)
华南地区 6 种阔叶幼苗叶片形态特征的季节变化	薛 立, 张 柔, 奚如春, 等 (123)
河西走廊不同红砂天然群体种子活性相关性	苏世平, 李 毅, 种培芳 (135)
江西中南部红壤丘陵区主要造林树种碳固定估算	吴 丹, 邵全琴, 李 佳, 等 (142)
酸雨和采食模拟胁迫下克隆整合对空心莲子草生长的影响	郭 伟, 李钧敏, 胡正华 (151)
棉铃虫在 4 个辣椒品种上的寄主适合度	贾月丽, 程晓东, 蔡永萍, 等 (159)
烟草叶面积指数的高光谱估算模型	张正杨, 马新明, 贾方方, 等 (168)
不同作物田烟粉虱发生的时空动态	崔洪莹, 戈 峰 (176)
长期施肥对稻田土壤固碳功能菌群落结构和数量的影响	袁红朝, 秦红灵, 刘守龙, 等 (183)
新银合欢篱对紫色土坡地土壤有机碳固持的作用	郭 甜, 何丙辉, 蒋先军, 等 (190)
一株产漆酶土壤真菌 F-5 的分离及土壤修复潜力	茆 婷, 潘 澄, 徐婷婷, 等 (198)
木论喀斯特自然保护区土壤微生物生物量的空间格局	刘 璐, 宋同清, 彭晚霞, 等 (207)
岷江干旱河谷 25 种植物一年生植株根系功能性状及相互关系	徐 琨, 李芳兰, 苟水燕, 等 (215)
黄土高原草地植被碳密度的空间分布特征	程积民, 程 杰, 杨晓梅, 等 (226)
棉铃发育期棉花源库活性对棉铃对位叶氮浓度的响应	高相彬, 王友华, 陈兵林, 等 (238)
耕作方式对紫色水稻土有机碳和微生物生物量碳的影响	李 辉, 张军科, 江长胜, 等 (247)
外源钙对黑藻抗镉胁迫能力的影响	闵海丽, 蔡三娟, 徐勤松, 等 (256)
强筋与弱筋小麦籽粒蛋白质组分与加工品质对灌浆期弱光的响应	李文阳, 闫素辉, 王振林 (265)
专论与综述	
蛋白质组学研究揭示的植物根盐胁迫响应机制	赵 琪, 戴绍军 (274)
流域生态风险评估研究进展	许 妍, 高俊峰, 赵家虎, 等 (284)
土壤和沉积物中黑碳的环境行为及效应研究进展	汪 青 (293)
研究简报	
青藏高原紫穗槐主要形态特征变异分析	梁坤伦, 姜文清, 周志宇, 等 (311)
菊属与蒿属植物苗期抗蚜虫性鉴定	孙 娅, 管志勇, 陈素梅, 等 (319)
滨海泥质盐碱地衬膜造林技术	景 峰, 朱金兆, 张学培, 等 (326)

期刊基本参数: CN 11-2031/Q * 1981 * m * 16 * 332 * zh * P * ¥ 70.00 * 1510 * 36 * 2012-01



封面图说: 白鹭展翅为梳妆, 玉树临风巧打扮——这是大白鹭繁殖期时的美丽体态。大白鹭体羽全白, 身长 94—104cm, 寿命 20 多年。是白鹭中体型最大的。繁殖期的大白鹭常常在湿地附近的大树上筑巢, 翩翩飞舞吸引异性, 其繁殖期背部披有蓑羽, 脸颊皮肤从黄色变成兰绿色, 嘴由黄色变成绿黑色。大白鹭是一个全世界都有它踪迹的广布种, 一般单独或成小群, 在湿地觅食, 以小鱼、虾、软体动物、甲壳动物、水生昆虫为主, 也食蛙、蝌蚪等。

彩图提供: 陈建伟教授 国家林业局 E-mail: cites.chenjw@163.com

DOI: 10.5846/stxb201011071595

袁红朝, 秦红灵, 刘守龙, 童成立, 葛体达, 魏文学, 吴金水. 长期施肥对稻田土壤固碳功能菌群落结构和数量的影响. 生态学报, 2012, 32(1): 0183-0189.

Yuan H Z, Qin H L, Liu S L, Tong C L, Ge T D, Wei W X, Wu J S. Abundance and composition of CO₂ fixating bacteria in relation to long-term fertilization of paddy soils. Acta Ecologica Sinica, 2012, 32(1): 0183-0189.

长期施肥对稻田土壤固碳功能菌群落结构和数量的影响

袁红朝^{1,2}, 秦红灵¹, 刘守龙¹, 童成立¹, 葛体达¹, 魏文学¹, 吴金水^{1,*}

(1. 中国科学院亚热带农业生态过程重点实验室, 长沙 410125; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 微生物固碳在减缓全球气候变化、实现人类可持续发展方面具有重要的意义, 通过揭示长期不同施肥制度对土壤固碳细菌的影响规律, 可以为我国稻田土壤科学施肥, 稻田固碳和温室气体减排的共轭双赢作用提供重要的理论依据。以湖南宁乡国家级稻田肥力变化长期定位试验为平台, 采用 PCR-克隆测序和实时荧光定量 (Real-time) PCR 技术, 研究不施肥 (CK), 氮磷钾肥 (NPK) 和氮磷钾加秸秆还田 (NPK plus crop residue return; NPKS) 3 种长期施肥制度对稻田土壤固碳细菌群落结构及数量的影响。通过分析固碳细菌 *cbbL* 基因文库发现, 长期施肥导致土壤固碳细菌种群结构产生了明显差异, NPK 和 NPKS 处理中兼性自养固碳菌群落优势增加而严格自养固碳菌生长受到抑制。LUBSHUFF 软件统计分析显示 *cbbL* 基因文库在 CK、NPK 及 NPKS 处理间均存在显著性差异。3 种施肥处理的稻田土壤细菌 *cbbL* 基因拷贝数为 3.35×10^8 — 5.61×10^8 /g 土, 施肥后, 土壤细菌 *cbbL* 基因数量增加, 其中 NPKS 处理 *cbbL* 数量最多, 是 CK 处理的 1.5 倍左右。稀疏曲线则显示长期施化肥导致细菌 *cbbL* 基因多样性高于 NPKS, 而 NPKS 高于 CK。上述结果表明了长期施肥对土壤固碳细菌群落结构、多样性及数量均有显著的影响。结果可为深入探讨稻田土壤微生物固碳潜力及其影响机理提供有力的依据。

关键词: 稻田土壤; 施肥; 多样性; *cbbL* 基因; 实时定量 PCR

Abundance and composition of CO₂ fixating bacteria in relation to long-term fertilization of paddy soils

YUAN Hongzhao^{1,2}, QIN Hongling¹, LIU Shoulong¹, TONG Chengli¹, GE Tida¹, WEI Wenxue¹, WU Jinshui^{1,*}

1 Key Laboratory of Agro-ecological Processes in Subtropical Region, Institute of Subtropical Agriculture, Chinese Academy of Sciences, Changsha 410125, China

2 Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: CO₂ fixation is the central mechanism of primary production in almost all ecosystems, and plays a major role in regulating the concentration of atmospheric CO₂. Carbon dioxide accounts for about 50% of the current global warming potential. Soil microorganisms that assimilate CO₂ are widely distributed, and have a great ability to adapt to environmental extremes, such as within volcanic sediments, lake wetlands and the submarine realm. Microbial CO₂ assimilation is of great significance to climate change mitigation and sustainable development for human beings.

It has now been well established that atmospheric concentration of CO₂ can be reduced significantly by adopting management practices to enhance CO₂ sequestration (storage) in cropland soils. Among the approaches for increasing CO₂ sequestration of croplands are soil fertilization management practices, such as returning crop residues to the soil, planting

基金项目: 国家自然科学基金项目 (40901124, 40701083, 40801098); 中国科学院知识创新工程青年人才领域前沿项目 (ISACX-LYQY-QN-0702)

收稿日期: 2010-11-07; **修订日期:** 2011-02-28

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: jswu@isa.ac.cn

temporarily retired land with grass for stabilization, and integrating nutrient management strategies to diversified cropping systems.

Paddy soils are distributed widely throughout the world, and generally are known for their production of greenhouse gasses (N_2O and CH_4). Numerous studies have used molecular techniques to investigate these microbial driving mechanisms. However, few studies have addressed the importance of microbial CO_2 fixation processes in paddy soils. Investigation of the impacts of long-term fertilization on the structure and abundance of CO_2 assimilating bacteria in paddy soils can provide a theoretical basis for the application of information on fertilization of paddy-rice fields. This type of research also may benefit the reduction of greenhouse gas emissions and increase carbon sequestration.

Although carbon fixating microorganisms exhibit a wide range of physiological and ecological traits, most photo- and chemoautotrophic bacteria use ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase (RubisCO), which catalyzes the first rate-limiting step in the Calvin cycle to incorporate atmospheric CO_2 . The *cbbL* gene, which encodes the large subunit of the form I RubisCO is especially useful as a functional marker for significant phylogenetic analyses of CO_2 fixating microorganisms in different ecological systems.

In this study, soil samples were collected from a long-term fertilization experiment, which included a station that received no fertilization (CK), one treated with chemical fertilization (NPK), and one with NPK plus crop residue return (NPKS). The abundance, diversity, and composition of soil- CO_2 fixating bacteria were determined using Polymerase Chain Reaction (PCR), cloning and sequencing, and real-time quantitative PCR of the *cbbL* gene to explore the effects of long-term fertilization on the structure and abundance of the CO_2 fixation bacterial community. Based on sequence libraries of *cbbL* genes, our results clearly demonstrate that there was a significant response difference in community composition with respect to long-term fertilization regimes. A total of 165 *cbbL* genotypes from three different treatment soils were divided into 14 bacterial *cbbL* gene phylotypes, mainly including *Bradyrhizobium*, *Ralstonia*, and *Thiobacillus*. Facultative autotrophic bacteria, such as *Bradyrhizobium* and *Ralstonia*, dominated both in NPK and NPKS treatment soils, while growth of the obligate autotrophic bacteria, such as *Thiobacillus* and *Nitrosospira*, were suppressed. LUBSHUFF statistical analyses also demonstrated that *cbbL* gene libraries of CK, NPK and NPKS treatments were significantly different from one another. The Rarefaction curve indicated that fertilizer addition increases *cbbL* gene diversity. Thus, the NPK treatment had the highest curve. The abundance of the bacterial *cbbL* gene ranged from 3.35×10^8 — 5.61×10^8 copies g^{-1} soil. Crop residue return NPKS had the highest abundance of bacterial *cbbL* gene, which was about one half the value of CK. Finally, application of chemicals and organic fertilizers in paddy ecosystems significantly influenced the CO_2 fixating bacterial community structure, and increased bacterial abundance and diversity. These results provide a strong basis for further investigation of fertilization on soil carbon sequestration potential and its related microbial mechanisms.

Key Words: paddy soil; fertilization; diversity; *cbbL* gene; real-time PCR

二氧化碳是对温室效应贡献最大的气体,占总效应的50%左右。如何减缓大气“温室效应”是全球环境问题中最重要且亟待解决的问题之一。目前,大多数科学家认为,通过合理利用土地,采取科学化的农田管理模式包括施用氮肥,免耕和保护性耕作,灌溉和秸秆还田等6项农田土壤固碳措施,可以提高陆地生态系统固碳能力,从而达到降低大气 CO_2 浓度,减缓全球变暖的目的,其中秸秆还田可能是最具前景的农田土壤固碳措施之一^[1-5]。生物固碳是陆地生态系统中最直接有效的二氧化碳固定途径,其中具有固碳功能的微生物分布广泛,它们有很强的环境适应能力,从整个生物圈的物质、能量流来看,二氧化碳的微生物固定是一支绝不容忽的生物固碳力量^[6-7]。因此,研究微生物固定二氧化碳的生态环境效应具现实意义。虽然,固碳细菌不是分类学上的特定类群,并且广泛分布在众多种属中,但大部分的光能自养生物和化能自养生物通过卡尔文循环固定 CO_2 ^[8],*cbbL*基因编码的核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶(RubisCO)是卡尔文循环中的关键酶,

该酶催化卡尔文循环中的第一步 CO_2 固定反应^[9]。因此, *cbbL* 基因也被许多学者用于环境样品的固碳细菌多样性研究, 研究热点从水生生态环境和光合细菌延伸到了陆地生态系统^[10-11]。Tolli 和 King^[12] 2003 年研究不同陆地生态系统及种植制度和土壤深度中固碳细菌群落结构和多样性的变化规律, 结果发现固碳细菌群落受植被类型和土地利用方式的影响。Selesi^[8] 等在种植小麦的土壤中发现, 施用化学肥料和混合堆肥后 *cbbL* 基因群落组成和多样性发生了明显改变。目前, 基于固碳细菌 *cbbL* 基因的分子生态学研究主要集中在旱作系统, 对于稻田土壤, 特别是不同施肥制度对稻田土壤固碳细菌群落及多样性影响的研究未见报道。我国稻田面积为 340 多万公顷, 以其淹水或者干湿交替的特殊田间水分管理方式而显著区别于旱地土壤, 是目前农田生态系统中受人为干扰最大, 最活跃的碳库之一。本研究利用长期定位施肥试验, 探讨不同施肥管理条件特别是施用化肥和秸秆还田对土壤固碳细菌群落结构和数量的影响, 以期通过优化田间管理, 调节土壤细菌群落结构, 增加固碳微生物优势种群, 减少氧化亚氮, 甲烷等温室气体的排放, 实现稻田土壤固碳和减排的双赢。

1 材料与方法

1.1 试验方案及样品采集

湖南省宁乡的国家级稻田土壤肥力变化长期定位监测点 (112°18'E, 28°07'N) 试验始于 1987 年, 供试土壤为河流冲积物发育的水稻土。施肥试验开始前土壤的基本肥力性状: 土壤有机碳 17.34 g/kg, 全氮 1.76 g/kg, 全磷 0.56 g/kg, 碱解氮 144.1 mg/kg, 有效磷 12.87 mg/kg, pH 5.2。本研究采集不施肥对照 (CK), 氮磷钾 (NPK) 和氮磷钾加秸秆还田 (NPK plus crop residue return; NPKS) 3 个处理。大田试验详细情况及化肥施用量等参数见文献^[13]。土壤样品采于 2009 年 9 月份 (土壤处于淹水期), 每个处理分 3 个小区分别采样, 小区面积为 22.2 m², 采用 5 点取样法取 (专用的稻田土采样器) 表层 0—15 cm 土壤并混匀。一部分土壤样品 (约 200 g) 用液氮冷冻后 -80℃ 保存, 供分子生物学研究, 另一部分土壤样品供常规分析, 土壤样品的基本理化性状见表 1。

1.2 土壤微生物总 DNA 的提取

参照 Porteous 等^[14] 的方法, 采用 SDS-GITC-PEG 法, 并作适当修改^[15]。所提取的土壤总 DNA 的浓度和纯度用紫外分光光度计测定 (Nanodrop, PeqLab, Germany)。

1.3 土壤固碳功能基因 *cbbL* 克隆、测序及多样性分析

cbbL 基因上游引物为 K2f^[12]: 5'-ACC A [C/T] C AAG CC [G/C] AAG CT [C/G] GG-3', 下游引物 V2r: 5'-GCC TTC [C/G] AG CTT GCC [C/G] AC C [G/A] C-3' (上海桑尼生物技术有限公司合成)。扩增片段包含功能性氨基酸残基的密码子, 片段长度为 492—495bp。

PCR 反应体系 (50 μL): TaqDNA 聚合酶缓冲液 5.0 μL, MgCl₂ 2.5 mmol/L, dNTPs 各 0.2 mmol/L, 上游和下游引物各 0.4 μmol/L, DNA 模板 50—100 ng, TaqDNA 聚合酶 (TaKaRa) 1U, 无菌水补水至 50 μL。PCR 反应条件如下: 95℃ 5 min; 35 个循环为 95℃ 45 s, 62℃ 45 s, 72℃ 90 s; 72℃ 终延伸 20 min。PCR 扩增反应仪: Eppendorf Mastercycler。

扩增的 PCR 产物用 PCR 纯化试剂盒 (TaKaRa) 纯化, 方法按说明进行。PCR 产物纯化后连接到 pGEM-T 载体, 构建重组质粒, 通过蓝白斑筛选, 从不同施肥处理中选择阳性克隆送至华大基因湖北分公司测序。将所得的序列在 NCBI 中进行同源性比对 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), 利用稀疏曲线 (Estimates win7.51) 进行多样性分析^[16]。

1.4 LUBSHUFF 分析处理间差异

利用 LUBSHUFF 软件 (<http://LUBSHUFF.mib.uga.edu/>) 比较不同施肥处理下, 固碳细菌群落组成是否存在差异^[17]。

1.5 土壤固碳细菌数量测定

采用实时荧光定量 (Real-time PCR) 测定细菌 *cbbL* 基因拷贝数, 引物 primer K2f/V2r, 10 μL 反应体系组成如下: 2×SYBR Premix Ex TaqTM 5 μL, 10 μmol/L 上游和下游引物各 0.5 μL, 各浓度梯度的质粒标准样品

DNA 1 μL , 无菌水 3 μL 。荧光定量 PCR 程序:按 (TaKaRa) 试剂盒操作说明书进行两步法 SYBR I 荧光定量 PCR 扩增,定量分析土壤固碳功能细菌数量。荧光定量实时 PCR 仪:ABI 7900, Foster City, CA, USA。

标准曲线制作:将测序获得的已知种属的阳性克隆子扩增培养后提取质粒 DNA,紫外吸收定量法 (OD_{260}) 检测浓度后,将其进行 10 倍梯度稀释,形成 10^3 — 10^8 拷贝/ μL ,作为 *cbbL* 基因的荧光定量的标准样品。所有样品均 3 次重复。以初始模板 DNA 量的对数为横坐标,以 PCR 反应过程中每个稀释样品的 C_t 值为纵坐标,绘制 *cbbL* 基因定量的标准曲线。标准曲线为 $C_t = -3.7161\lg C + 32.057$ ($R^2 = 0.991$),扩增效率为 86%。

土壤固碳细菌的数量检测:将土壤微生物 DNA 样品稀释至 5 ng/ μL 左右作为模板,反应程序和体系反应体系同上。

1.6 统计分析

所有测定结果均为 3 次重复的平均值,所得数据采用 Excel 2003 和 SPSS 16.0 软件进行处理与统计分析,各处理平均值差异显著性检验采用 Duncan 法,相关性分析采用 Pearson 法。

2 结果

2.1 土壤理化性质

3 种施肥处理土壤样品的部分理化性质见表 1。长期不同施肥制度的土壤理化性质发生了较大分异,秸秆还田处理的土壤有机质,速效养分含量均高于不施肥和化肥处理,而 pH 值相对较低。

表 1 3 种不同施肥处理方式下稻田土壤的基本理化性质

Table 1 The physical and chemical properties of the three fertilizer treatmental paddy soils

处理 Treatments	pH	有机碳 SOC /(g/kg)	全氮 TN /(g/kg)	碱解氮 Available N /(mg/kg)	有效磷 Olsen P /(mg/kg)	速效钾 Available K /(mg/kg)
CK	6.8±0.1 a	18.01±0.44 c	1.76±0.03 c	144.08±6.35 c	9.23±0.39 b	43.78±0.97 a
NPK	6.6±0.1 a	19.06±0.32 b	1.98±0.03 b	159.01±2.65 b	9.37±0.18 b	44.25±0.79 a
NPKS	6.2±0.1 b	23.42±0.01 a	2.44±0.05 a	171.74±2.66 a	10.25±0.37 a	46.41±1.45 a

平均值±标准偏差 ($n=3$);相同的字母代表同一区组内数值差异不显著 ($P<0.05$);CK 代表不施肥处理,NPK 代表化肥处理;NPKS plus crop residue return 代表秸秆处理,下同

2.2 多样性和系统发育分析

从 3 种施肥处理的稻田土壤 DNA 样品中成功扩增了 *cbbL* 基因,通过 Clustal W 软件比较序列的相似性,将相似性大于 98% 的序列归为同一种可操作分类单元 (Operational taxonomic unit, OTU)。从 CK, NPK, NPKS 处理的土壤中分别获得了 48 个, 65 个, 52 个 OTUs, 序列间的相似性 64%—98%。本研究获得的 165 个 *cbbL* 基因型大致分布在 14 个细菌属 (图 1): 产碱菌属 (*Alcaligenes*)、氨基杆菌属 (*Aminobacter*)、固氮螺菌属 (*Azospirillum*)、慢生根瘤菌属 (*Bradyrhizobium*)、着色菌属 (*Chromatium*)、分枝杆菌属 (*Mycobacterium*)、亚硝化螺菌属 (*Nitrosospira*)、劳尔氏菌属 (*Ralstonia*)、红细菌属 (*Rhodobacter*)、红假单胞菌属 (*Rhodopseudomonas*)、聚球蓝细菌属 (*Synechococcus*)、硫杆菌属 (*Thiobacillus*)、硫螺菌属 (*Thiohalospira*)、黄色杆菌属 (*Xanthobacter*)。

不同施肥处理固碳细菌种属分布及相对丰度不同 (图 1)。CK 处理的 *cbbL* 基因型类群最少,仅分布在 11 个细菌属,其中优势种属为慢生根瘤菌,亚硝化螺菌,劳尔氏菌和硫杆菌,相对丰度分别为 17.4%, 19.6%, 14.1% 和 25.1%。NPK 处理的 OTUs 在 14 个细菌种属中均有分布,其中氨细菌属,慢生根瘤菌属,劳尔氏菌属和硫杆菌是该处理的优势种群,相对丰度为 13.9%, 15.7%, 16.5% 和 13.9%。NPKS 处理的 OTU 除着色菌属和硫螺菌属外在其他 12 个细菌属中有分布,优势种群为产碱杆菌,慢生根瘤菌,劳尔氏菌和硫杆菌,它们在克隆文库中所占比例分别为 18.4%, 24.5%, 14.0% 和 10.5%。与 CK 处理相比,施肥 (NPK 和 NPKS) 处理产碱杆菌相对丰度明显增加,而亚硝化螺菌丰度显著下降。另外, NPK 处理的氨细菌丰度远高于 CK 处理和 NPKS 处理, CK 处理和 NPKS 处理之间差异不明显。

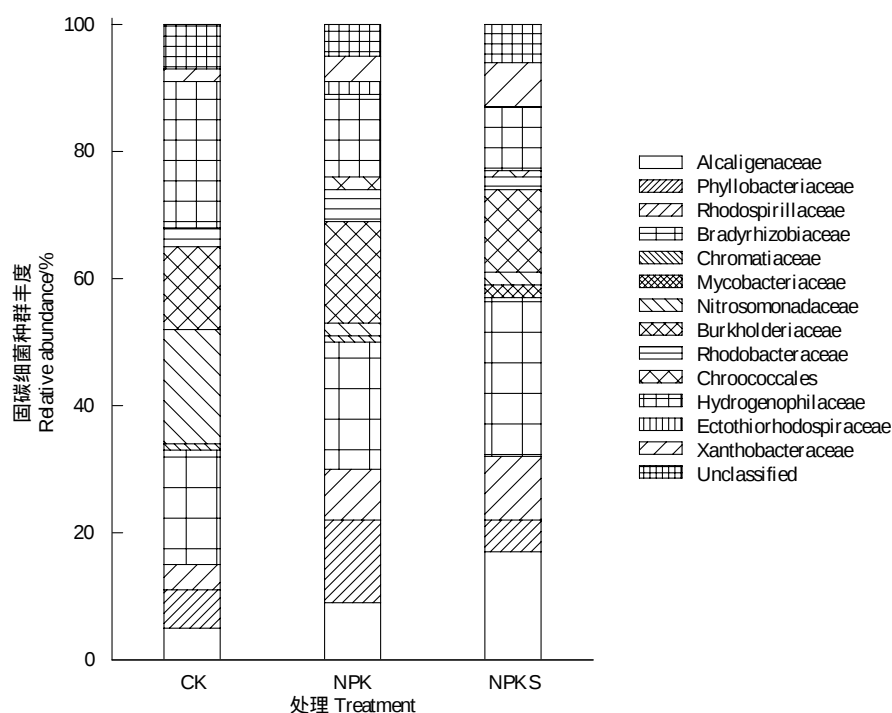


图1 CK, NPK 和 NPKS 处理中固碳菌类群在基因文库中所占比例

Fig. 1 Distribution of *cbbL* gene phylotypes among the clone libraries of CK, NPK, NPKS treatments

2.3 稀疏曲线

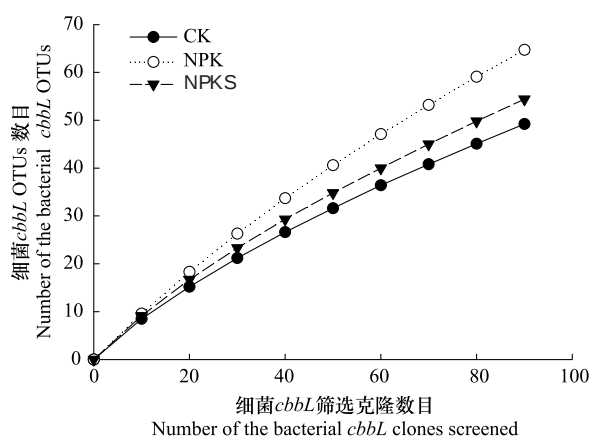
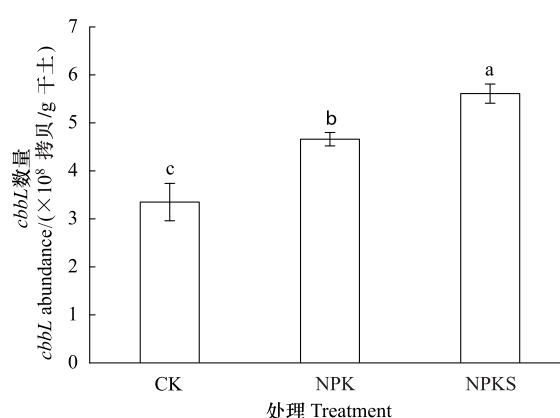
稀疏曲线的结果显示,NPK 处理中细菌 *cbbL* 基因的多样性高于 CK 和 NPKS 处理,NPKS 处理的多样性明显高于 CK。此外,3 种施肥处理获得的 *cbbL* 基因稀疏曲线都没有达到平台期(图 2)

2.4 LUBSHUFF 比较处理间的差异

LUBSHUFF 软件统计结果显示,*cbbL* 克隆文库在 CK 与 NPK 及 NPKS 处理之间存在显著性差异($P < 0.05$),说明化肥或者化肥和有机肥的联合施用能够对含 *cbbL* 基因的细菌群落组成造成显著性的影响。

2.5 施肥对稻田土壤固碳细菌数量的影响

用实时荧光定量 PCR 对不同处理稻田土壤细菌 *cbbL* 基因的丰度进行分析(图 3)。稻田土壤 3 种施肥处理 *cbbL* 拷贝数量分别为 3.35×10^8 — 5.61×10^8 拷贝/g 土。施肥处理土壤(NPK 和 NPKS) *cbbL* 数量显著高于不施肥处理(CK),其中,NPKS 处理的 *cbbL* 数量最多,显著高于 CK 和 NPK 处理($P < 0.05$),约为 CK 的 1.5 倍。

图2 细菌 *cbbL* 克隆文库的稀疏曲线Fig. 2 Rarefaction curve of clone libraries of bacterial *cbbL*
一种可操作分类单元(Operational taxonomic unit, OTU)图3 不同施肥处理土壤固碳基因(*cbbL*)数量Fig. 3 The *cbbL* abundance quantified from the three fertilization treatment soils

2.6 固碳细菌多样性、数量与土壤理化性质的关系

利用 SPSS 软件分析了 *cbbL* 基因数量与土壤理化性质的相关性。结果显示, *cbbL* 数量与土壤有机质和氮磷钾养分含量有显著的正相关关系 ($R>0.844, P<0.05, n=9$), 其中与有机质的关系最为密切 ($R=0.919, P<0.01, n=9$), 而与土壤 pH 值有显著的负相关关系 ($R=0.783, P<0.05, n=9$)。通过对 *cbbL* 基因多样性及所测得的土壤理化性质的变化趋势进行比较, 未发现两者之间存在明显相关关系。

3 讨论与结论

长期施肥对土壤固碳细菌种群结构产生了明显的影响。本研究从稻田土壤中获得的 *cbbL* 基因型大致分布在 14 个细菌种属中, 主要分为两大类群, 即严格自养菌和兼性自养菌, 其中氨细菌, 硫杆菌, 亚硝化螺菌等为严格自养菌, 而产碱杆菌, 慢生根瘤菌, 劳尔氏菌等为兼性自养菌^[18-20]。施肥导致严格自养菌和兼性自养菌的群落结构产生明显变化, 即严格自养菌丰度显著下降, 而兼性自养菌丰度增加。CK 处理中, 严格自养固碳菌所占比例较大, 超过了 50%, 而在 NPK 处理为 31%, NPKS 处理最低, 仅为 17%。究其原因可能有以下两方面: 1) 施肥改变了土壤环境和养分含量, 与不施肥相比, 施肥 (化肥和秸秆还田) 处理的氮磷钾等养分含量提高, 土壤 pH 值下降, 特别是秸秆还田处理的土壤有机质和速效养分含量均显著高于不施肥处理和化肥处理。2) 不同类型细菌的生存策略不同, 生长所需要的养分不同。严格自养菌生长需要无机离子 (NH_4^+ , NO_3^- , Fe^{2+} 等) 作为电子供体。而且, 与兼性自养菌比较, 严格自养菌更喜好较低有机质含量和养分贫瘠的土壤环境^[8]。兼性自养菌能适应更多环境条件, 特别是产碱杆菌 (*Ralstonia eutropha* 和 *Alcaligenes eutrophus*) 不仅能通过 Calvin 循环进行自养生长, 而且还能够利用丰富的多糖类物质作为碳源合成自身有机物质-聚羟基烷酸酯^[20]进行异养繁殖。施肥通过改变土壤环境和养分含量对微生物的生长和代谢活性产生影响。施化肥 (NPK) 处理中大量氮肥 (NH_4^+-N) 投入, 导致该处理中氨细菌种群优势明显增加, 而有机质的大量投入让严格自养菌的生长受到抑制, 产碱杆菌等兼性自养细菌种群丰度增加。LUBSHUFF 结果显示 NPK 和 NPKS 处理的细菌 *cbbL* 基因文库与 CK 相比都达到了显著性差异 ($P<0.05$), 进一步说明这两种施肥制度明显改变了土壤固碳细菌的群落结构。另外, 施肥还影响了细菌 *cbbL* 多样性, 施化肥 (NPK) 细菌 *cbbL* 多样性最高, 其次是 NPKS, CK 处理最低。从稀疏曲线也可看出同样的趋势。这可能是由于施用的 NPK 能提供均衡的养分, 增加土壤细菌 *cbbL* 基因的多样性, 而在 NPK 基础上施用秸秆 (NPKS) 后, 使土壤有机质含量升高而 pH 值下降, 使某些严格自养菌无法生存或是趋同进化, 因此 *cbbL* 基因多样性有所下降。这一结果与 Selesi^[8] 等的研究基本一致。虽然本文测序的克隆数达 90—120 个, 超过大多数文献报道的测序数 (一般 30—50 个)^[8-12, 21], 但由于 *cbbL* 基因的稀疏曲线还未达到平台期, 进一步说明水稻土细菌 *cbbL* 基因多样性较高。

施肥对 *cbbL* 基因数量的影响与种群结构变化规律不完全一致, 与不施肥相比, 施用化肥及有机肥与化肥配施均可以显著的提高 *cbbL* 基因数量, 特别是秸秆还田处理的 *cbbL* 基因数量最多, 统计分析结果显示土壤 *cbbL* 基因数量与土壤有机质含量关系最为密切, 显著正相关, 该结论与 Selesi^[22] 研究施肥对土壤兼性自养菌数量影响的结果一致。这是由于施用肥料后, 土壤中的营养元素和有机质含量增加, 土壤 pH 值下降, 土壤养分的有效性提高, 为土壤兼性自养菌提供了生长所需的营养元素以及丰富的碳源和能源, 细菌生长活性增加。

本研究表明长期施肥制度可能深刻影响了土壤固碳细菌群落结构, 多样性及数量。施用有机肥后, 细菌 *cbbL* 基因多样性和数量显著提高。研究结果可为深入探讨施肥对稻田土壤固碳潜力影响及其机理研究提供有力的依据。当然要深入了解土壤固碳过程, 一次采样和单个基因并不能表征水稻土微生物固定 CO_2 的真实过程。首先, 不能排除季节性因素和时空变化的影响。其次, 一些其他的 CO_2 固定途径也应加以考虑, 如厌氧乙酰辅酶 A^[23], 还原性三羧酸循环^[24], 琥珀酰辅酶 A^[25], 需要定量研究这些生物固碳过程中的关键基因及其表达特征, 了解这些微生物固定 CO_2 的具体贡献。

References:

- [1] Lal R, Follett R F, Kimble J M. Achieving soil carbon sequestration in the United States: a challenge to policy makers. Soil Science, 2003, 168

- (12): 827-845.
- [2] Sombrero A, de Benito A. Carbon accumulation in soil. Ten-year study of conservation tillage and crop rotation in a semi-arid area of Castile-Leon, Spain. *Soil and Tillage Research*, 2010, 107(2): 64-70.
- [3] Franzluebbers A J. Achieving soil organic carbon sequestration with conservation agricultural systems in the southeastern United States. *Soil Science Society of America journal*, 2010, 74(2): 347-357.
- [4] Triberti L, Nastri A, Giordani G, Comellini F, Baldoni G, Toderi G. Can mineral and organic fertilization help sequester carbon dioxide in cropland? *European Journal of Agronomy*, 2008, 29(1): 13-20.
- [5] Lu F, Wang X K, Han B, Ouyang Y Z, Duan X N, Zheng H, Miao H. Soil carbon sequestrations by nitrogen fertilizer application, straw return and no-tillage in China's cropland. *Global Change Biology*, 2009, 15(2): 281-305.
- [6] Nanba K, King G M, Dunfield K. Analysis of facultative lithotrophic distribution and diversity on volcanic deposits by use of the large subunit of ribulose 1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(4): 2245-2253.
- [7] Elsaied H, Naganuma T. Phylogenetic diversity of Ribulose- 1, 5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase large-subunit genes from deep-sea microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(4): 1751-1765.
- [8] Selesi D, Schmid M, Hartmann A. Diversity of green-like and red-like ribulose-1. 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large-subunit genes (*cbbL*) in differently managed agricultural soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 171 (1): 175-184.
- [9] Tabita F R. Microbial ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase: a different perspective. *Photosynthesis Research*, 1999, 60(1): 1-28.
- [10] Paul J, Alfrieder A, Wawrik B. Micro- and macrodiversity in *rbcL* sequences in ambient phytoplankton populations from the southeastern Gulf of Mexico. *Marine Ecology Progress Series*, 2000, 198: 9-18.
- [11] Xu H H, Tabita F R. Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase gene expression and diversity of Lake Erie planktonic microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(6): 1913-1921.
- [12] Tolli J, King G M. Diversity and structure of bacterial chemolithotrophic communities in pine forest and agroecosystem soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(12): 8411-8418.
- [13] Peng P Q, Qiu S J, Tong C L, Ren X E. Effects of long-term application of fertilizers on soil microbial biomass nitrogen and organic nitrogen components in subtropical paddy soils. *Environmental Science*, 2007, 28(8): 1816-1821.
- [14] Porteous L A, Armstrong J L, Seidler R J, Watrud L S. An effective method to extract DNA from environmental samples for polymerase chain reaction amplification and DNA fingerprint analysis. *Current Microbiology*, 1994, 29(5): 301-307.
- [15] Chen Z, Luo X Q, Hu R G, Wu M N, Wu J S, Wei W X. Impact of long-term fertilization on the composition of denitrifier communities based on nitrite reductase analyses in a paddy soil. *Microbial Ecology*, 2010, 60(4): 850-861.
- [16] Hill T C J, Walsh K A, Harris J A, Moffett B F. Using ecological diversity measures with bacterial communities. *FEMS Microbiology Ecology*, 2003, 43(1): 1-11.
- [17] Singleton D R, Furlong M A, Rathbun S L, Whitman W B. Quantitative comparisons of 16S rRNA gene sequence libraries from environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(9): 4374-4376.
- [18] Meyer O, Frunzke K, Gadkari D, Jacobitz S, Hugendieck I, Kraut M. Utilization of carbon monoxide by aerobes: recent advances. *FEMS Microbiology Reviews*, 1990, 87(3/4): 253-260.
- [19] Falcone D L, Tabita F R. Expression and regulation of *Bradyrhizobium japonicum* and *Xanthobacter flavus* CO₂ fixation genes in a photosynthetic bacterial host. *Journal of Bacteriology*, 1993, 175(3): 866-874.
- [20] Yabuuchi E, Kosako Y, Yano I, Hotta H, Nishiuchi Y. Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov.: proposal of *Ralstonia pickettii* (ralston, palleroni and doudoroff 1973) comb. Nov., *ralstonia solanacearum* (smith 1896) comb. nov. and *ralstonia eutropha* (davis 1969) comb. nov. *Microbiology and Immunology*, 1995, 39(11): 897-904.
- [21] Pichard S L, Campbell L, Paul J H. Diversity of the ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase form I gene (*rbcL*) in natural phytoplankton communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(9): 3600-3606.
- [22] Selesi D, Pattis I, Schmid M, Kandeler E, Hartmann A. Quantification of bacterial RubisCO genes in soils by *cbbL* targeted real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 2007, 69(3): 497-503.
- [23] Ragsdale S W. Enzymology of the Acetyl-CoA pathway of CO₂ fixation. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 1991, 26(3/4): 261-300.
- [24] Buchanan B B, Arnon D I. A reverse KREBS cycle in photosynthesis: consensus at last. *Photosynthesis Research*, 1990, 24(1): 47-53.
- [25] Fan Z L. The fifth carbon fixation pathway. *Chinese Journal of Nature*, 2008, 30(2): 93.

参考文献:

- [13] 彭佩钦, 仇少君, 童成立, 任秀娥. 长期施肥对水稻土耕层微生物生物量氮和有机氮组分的影响. *环境科学*, 2007, 28(8): 1816-1821.
- [25] 范宗理. 第五条固碳途径. *自然杂志*, 2008, 30(2): 93.

ACTA ECOLOGICA SINICA Vol.32 ,No.1 January ,2012(Semimonthly)

CONTENTS

Allee effects of local populations and the synchrony of metapopulation	LIU Zhiguang, ZHAO Xue, ZHANG Fengpan, et al (1)
Effects of leaf hair points on dew deposition and rainfall evaporation rates in moss crusts dominated by <i>Syntrichia caninervis</i> , Gurbantunggut Desert, northwestern China	TAO Ye, ZHANG Yuanming (7)
The influence of freshwater-saline water mixing on phytoplankton growth in Changjiang Estuary	WANG Kui, CHEN Jianfang, LI Hongliang, et al (17)
The responses of hydrological indicators to watershed characteristics	TIAN Di, LI Xuyong, Donald E. Weller (27)
Lake nutrient ecosystems in the east-central moist subtropical plain of China	KE Xinli, LIU Man, DENG Xiangzheng (38)
The current water trophic status in Tiaoxi River of Taihu Lake watershed and corresponding coping strategy based on N/P ratio analysis	NIE Zeyu, LIANG Xinqiang, XING Bo, et al (48)
Reversion and analysis on cyanobacteria bloom in Waihai of Lake Dianchi	SHENG Hu, GUO Huaicheng, LIU Hui, et al (56)
Effects of cutting disturbance on spatial heterogeneity of fine root biomass of <i>Larix principis-rupprechtii</i>	YANG Xiuyun, HAN Youzhi, ZHANG Yunxiang, et al (64)
Responses of elm (<i>Ulmus pumila</i>) woodland to different disturbances in northeastern China	LIU Li, WANG He, LIN Changcun, et al (74)
Impacts of grazing and climate change on the aboveground net primary productivity of mountainous grassland ecosystems along altitudinal gradients over the Northern Tianshan Mountains, China	ZHOU Decheng, LUO Geping, HAN Qifei, et al (81)
Response of herbaceous vegetation to phosphorus fertilizer in steppe desert	SU Jieqiong, LI Xinrong, FENG Li, et al (93)
Spatiotemporal characteristics of landscape change in the coastal wetlands of Yancheng caused by natural processes and human activities	ZHANG Huabing, LIU Hongyu, HAO Jingfeng, et al (101)
Response of species diversity in <i>Caragana Korshinskii</i> communities to climate factors and grazing disturbance in Shanxi, Shaanxi, Ningxia and Inner Mongolia	ZHOU Ling, SHANGGUAN Tieliang, GUO Donggang, et al (111)
Seasonal change of leaf morphological traits of six broadleaf seedlings in South China	XUE Li, ZHANG Rou, XI Ruchun, GUO Shuhong, et al (123)
Correlation analysis on <i>Reaumuria soongorica</i> seed traits of different natural populations in Gansu Corridor	SU Shiping, LI Yi, CHONG Peifang (135)
Carbon fixation estimation for the main plantation forest species in the red soil hilly region of southern-central Jiangxi Province, China	WU Dan, SHAO Quanqin, LI Jia, et al (142)
Effects of clonal integration on growth of <i>Alternanthera philoxeroides</i> under simulated acid rain and herbivory	GUO Wei, LI Junmin, HU Zhenghua (151)
Difference of the fitness of <i>Helicoverpa armigera</i> (Hübner) fed with different pepper varieties	JIA Yueli, CHENG Xiaodong, CAI Yongping, et al (159)
Hyperspectral estimating models of tobacco leaf area index	ZHANG Zhengyang, MA Xinming, JIA Fangfang, et al (168)
Temporal and spatial distribution of <i>Bemisia tabaci</i> on different host plants	CUI Hongying, GE Feng (176)
Abundance and composition of CO ₂ fixating bacteria in relation to long-term fertilization of paddy soils	YUAN Hongzhao, QIN Hongling, LIU Shoulong, et al (183)
Effect of <i>Leucaena leucocephala</i> on soil organic carbon conservation on slope in the purple soil area	GUO Tian, HE Binghui, JIANG Xianjun, et al (190)
Isolation and the remediation potential of a Laccase-producing Soil Fungus F-5	MAO Ting, PAN Cheng, XU Tingting, et al (198)
Spatial heterogeneity of soil microbial biomass in Mulun National Nature Reserve in Karst area	LIU Lu, SONG Tongqing, PENG Wanxia, et al (207)
Root functional traits and trade-offs in one-year-old plants of 25 species from the arid valley of Minjiang River	XU Kun, LI Fanglan, GOU Shuiyan, et al (215)
Spatial distribution of carbon density in grassland vegetation of the Loess Plateau of China	CHENG Jimin, CHENG Jie, YANG Xiaomei, et al (226)
Effect of nitrogen concentration in the subtending leaves of cotton bolls on the strength of source and sink during boll development	GAO Xiangbin, WANG Youhua, CHEN Binglin, et al (238)
Long-term tillage effects on soil organic carbon and microbial biomass carbon in a purple paddy soil	LI Hui, ZHANG Junke, JIANG Changsheng, et al (247)
Effects of exogenous calcium on resistance of <i>Hydrilla verticillata</i> (L. f.) Royle to cadmium stress	MIN Haili, CAI Sanjuan, XU Qinsong, et al (256)
Comparison of grain protein components and processing quality in responses to dim light during grain filling between strong and weak gluten wheat cultivars	LI Wenyang, YAN Suhui, WANG Zhenlin (265)
Review and Monograph	
Salt-responsive mechanisms in the plant root revealed by proteomic analyses	ZHAO Qi, DAI Shaojun (274)
The research progress and prospect of watershed ecological risk assessment	XU Yan, GAO Junfeng, ZHAO Jiahu, et al (284)
A review of the environmental behavior and effects of black carbon in soils and sediments	WANG Qing (293)
Scientific Note	
Variation in main morphological characteristics of <i>Amorpha fruticosa</i> plants in the Qinghai-Tibet Plateau	LIANG Kunlun, JIANG Wenqing, ZHOU Zhiyu, et al (311)
Identification of aphid resistance in eleven species from <i>Dendranthema</i> and <i>Artemisia</i> at seedling stage	SUN Ya, GUAN Zhiyong, CHEN Sumei, et al (319)
Research of padded film for afforestation in coastal argillaceous saline-alkali land	JING Feng, ZHU Jinzhao, ZHANG Xuepei, et al (326)

《生态学报》2012 年征订启事

《生态学报》是中国生态学学会主办的自然科学高级学术期刊,创刊于 1981 年。主要报道生态学研究原始创新性科研成果,特别欢迎能反映现代生态学发展方向的优秀综述性文章;研究简报;生态学新理论、新方法、新技术介绍;新书评介和学术、科研动态及开放实验室介绍等。

《生态学报》为半月刊,大 16 开本,280 页,国内定价 70 元/册,全年定价 1680 元。

国内邮发代号:82-7 国外邮发代号:M670 标准刊号:ISSN 1000-0933 CN 11-2031/Q

全国各地邮局均可订阅,也可直接与编辑部联系购买。欢迎广大科技工作者、科研单位、高等院校、图书馆等订阅。

通讯地址:100085 北京海淀区双清路 18 号 电 话:(010)62941099; 62843362

E-mail: shengtaixuebao@rcees.ac.cn 网 址: www.ecologica.cn

编辑部主任 孔红梅 执行编辑 刘天星 段 靖

生 态 学 报
(SHENGTAI XUEBAO)
(半月刊 1981 年 3 月创刊)
第 32 卷 第 1 期 (2012 年 1 月)

ACTA ECOLOGICA SINICA
(Semimonthly, Started in 1981)
Vol. 32 No. 1 2012

编 辑	《生态学报》编辑部 地址:北京海淀区双清路 18 号 邮政编码:100085 电话:(010)62941099 www.ecologica.cn shengtaixuebao@rcees.ac.cn	Edited by	Editorial board of ACTA ECOLOGICA SINICA Add:18, Shuangqing Street, Haidian, Beijing 100085, China Tel:(010)62941099 www.ecologica.cn Shengtaixuebao@rcees.ac.cn
主 编	冯宗炜	Editor-in-chief	FENG Zong-Wei
主 管	中国科学技术协会	Supervised by	China Association for Science and Technology
主 办	中国生态学学会 中国科学院生态环境研究中心 地址:北京海淀区双清路 18 号 邮政编码:100085	Sponsored by	Ecological Society of China Research Center for Eco-environmental Sciences, CAS Add:18, Shuangqing Street, Haidian, Beijing 100085, China
出 版	科 学 出 版 社 地址:北京东黄城根北街 16 号 邮政编码:100717	Published by	Science Press Add:16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China
印 刷	北京北林印刷厂	Printed by	Beijing Bei Lin Printing House, Beijing 100083, China
发 行	科 学 出 版 社 地址:东黄城根北街 16 号 邮政编码:100717 电话:(010)64034563 E-mail:journal@cspg.net	Distributed by	Science Press Add:16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China Tel:(010)64034563 E-mail:journal@cspg.net
订 购	全国各地邮局	Domestic	All Local Post Offices in China
国外发行	中国国际图书贸易总公司 地址:北京 399 信箱 邮政编码:100044	Foreign	China International Book Trading Corporation Add:P. O. Box 399 Beijing 100044, China
广告经营 许 可 证	京海工商广字第 8013 号		



ISSN 1000-0933
CN 11-2031/Q

国内外公开发行

国内邮发代号 82-7

国外发行代号 M670

定价 70.00 元